研究用試薬

TESTSKIN

ヒト皮膚再構築モデル

LSE-high（Living Skin Equivalent-high）

TMLSE-003
（角質改善タイプ）

取扱説明書

ご使用の際には、必ずお読み下さい。

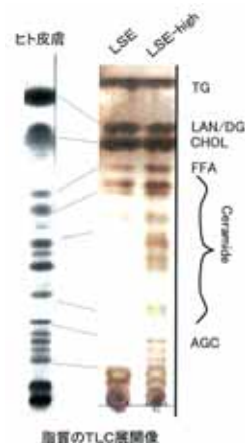
このたびは、TESTSKIN（テストスキン）をお買い上げ頂きありがとうございます。
皆様の研究・評価試験に有効にお使い頂くために、本取り扱い説明書をお読みください。

■ LSE-*high* の特徴

LSE-*high* は当社独自の培養技術により培養皮膚の**角質を改良したモデル**です。

これにより、従来の標準LSE（Code No.TMLSE-001)に比べ水透過性が1／3以上減少し、皮膚透過性が、さらにヒト皮膚に近似した皮膚モデルとなりました。また、皮膚バリアに重要なセラミドも豊富に認められ、角質脂質構成も一段とヒト皮膚に近づきました。

このため、従来よりご利用頂きました *in vitro* 皮膚刺激性試験だけでなく、経皮吸収試験や皮膚代謝試験など、動物皮膚代替実験に幅広く使用することができます。

脂質のTLC展開像

■ 製品内容

（1） 1セットに含まれるもの

・組織トレイ（6個入り）	1枚
・アッセイトレイ（6穴）	1枚
・アッセイリング	6個
・LSEアッセイ培地	100ml x 2本
・シリコンチューブ	1本

（2） 内容の説明

(1) 組織トレイ（下図参照）

組織は、トランスウェルのポリカーボネート膜上に張り付いた状態でのっており、1トレイあたり6個のトランスウェル（組織）が入っています。組織は、通常ポリカーボネート膜に張り付いた状態（トランスウェルのまま）で使用します。組織をポリカーボネート膜から剥がす必要はありません。
トランスウェルは、寒天培地上にのせられた状態で送付されます。

(2) アッセイトレイ

6穴の培養用プレートです。通常の実験では、組織トレイから組織含トランスウェル（以下：トランスウェル）を取り出し、このアッセイトレイに移して使用します。

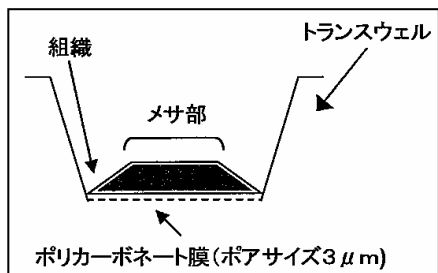
(3) アッセイリング

被験物を添加する時に用います。リングの直径は、10mmです。アッセイリングの適用により暴露面積を一定にする事ができます。アッセイリングの中央部への適用量は、最小80μl、最大200μlまでになります。

(4) シリコンチューブ

アッセイリングを組織表面に接着させるときに使用します。

(5) LSEアッセイ培地

実験するときに使用する培地です。

*)メサ部：組織の頂上部を示し、その部分は、組織の厚み等が一定のところになります。薬物などの添加は、このメサ部に対し行うことになります。アッセイリングを用いた場合、アッセイリング内部がこのメサ部に相当します。

■製品の受け入れ

（1）受け取り後のチェック

お受け取り後、直ちに開封し、液漏れ、組織トレイ内の寒天培地の色調、LSEアッセイ培地の濁り、破損についてチェックしてください。組織トレイ内の寒天培地の色調については、送付時に添付しております培地pHチャートを参考にチェックしてください。
組織トレイ、LSEアッセイ培地については、必ず使用期限をご確認ください。
万が一、問題があった場合は、直ちに下記までご連絡ください。

東洋紡績株式会社　ライフサイエンス事業部
（06）6348－3786

（2）保存と有効期限

・組織トレイは、受け取り後、輸送用発泡スチロール箱から取り出し、20～37℃(好ましくは約30℃、)のインキュベーター等で包装形状または20～30℃室内では、発泡スチロール内で室温で保存してください。使用期限は、組織トレイに記載しております。使用期限内にご使用下さい。
・LSEアッセイ培地は、冷蔵（4℃）に保存してください。使用期限は、培地ラベルに記載されております。
・アッセイトレイ、アッセイリング、シリコンチューブは、室温に保存してください。

■実験道具と環境

（1）実験室

アッセイ培地には抗生物質が含まれるため、24時間程度の被験暴露、または培養時間でのご使用の場合、クリーンベンチ等で使用する必要はありません。埃、粉塵等が舞う場所を除き、通常の実験室内で行えます。但し、3～4日にわたる培養実験の場合は、通常の細胞培養実験と同様に無菌操作でご使用ください。

（2）インキュベーター

CO_2インキュベーター（設定温度：37℃）が必要です。
もしCO_2インキュベーターをお持ちでない場合は、通常のインキュベーター(37℃)に、蒸留水と10％重曹液を入れた密閉可能な容器等を入れて簡易CO_2インキュベーターとしてご使用ください。

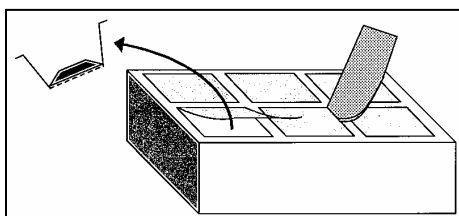
（3）吸光度測定機器

MTT試験を行う場合、96穴プレートリーダーをお使いください。
もし、お持ちでない場合は、マイクロセルを用いて分光光度計で測定してください。

（4)その他消耗品

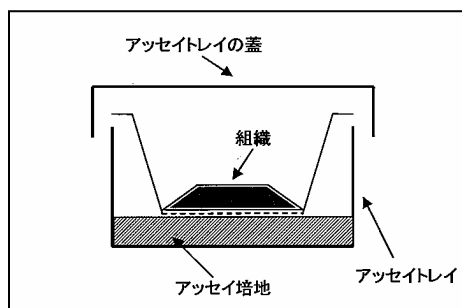
LSEを用い、MTT試験を行う場合、下記の器具が必要となります。
ピンセット、ピペット類、栓付き小試験管（またはエッペンドルフチューブ）、バイオプシーパンチ（8mmφ）*、MTT試薬、酸性イソプロパノール（塩酸＋イソプロパノール）
＊バイオプシーパンチをご入用の際は、当社までお問い合わせください。

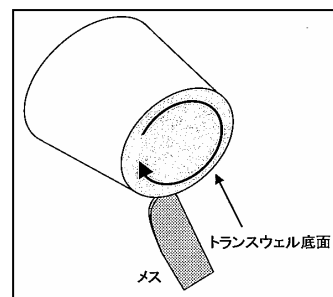
■使用方法

（1)トランスウェルの取り出し方

組織トレイを包装より取り出し、各ウェルのシールを清潔なメスまたはカッターナイフでウェル外壁に沿って3辺に切込みを入れ開けます。ピンセット等を用いて、トランスウェルとアガロース培地の間に空気を入れるようにしてトランスウェルを取り出します。取り出したトランスウェルは、アッセイトレイに移します。

無菌的に組織を取り出すときは、包装より組織トレイを取り出し、クリーンベンチに入れ同様の操作を行ってください。

（2)基本実験様式

アッセイトレイの各ウェルに、LSEアッセイ培地を1．2ml入れます。
通常、本モデルは組織上面を空気にさらした状態で使用します。

（3)組織のみの利用

経皮吸収試験や組織標本の作製など、組織のみを使用される場合は、トランスウェル底面よりメスなどを用いてポリカーボネート膜ごとウェル周縁にそって切り抜いて下さい。組織はポリカーボネート膜より剥がさない方が取扱いが簡便です。

■MTT試験方法

TMLSE－003を用いて in vitro 皮膚刺激性試験を行う場合は以下の手順で行います。なお、本法は基本的な使用方法ですので、実験目的により種々変更を加えお使い戴けます。本法について別紙に図表入りで説明してありますので、ご参考にしてください。

①準備

(1)MTT培地：MTT反応前に用事調製します。
MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]を
10mg秤取り、室温に戻したLSEアッセイ培地 30ml に溶解します。終濃度は、0．333mg／mlとなります。MTTは黄色物質ですが、細胞内のミトコンドリア還元酵素により不溶性の青色ホルマザンが生成されます。生細胞が青色に発色することを利用して生存率を求めます。MTTは還元反応により発色するので、還元作用のある被検物の適用については洗浄を十分行うなどの特別な対応を行ってください。

(2)酸性イソプロパノール(抽出液)
イソプロパノール100ml に濃塩酸(12N)を 0．333ml 加え混和させます。終濃度は0．04N塩酸－イソプロパノールとなります。

②実験操作

(1)アッセイトレイに移した組織 (トランスウェル：以下LSE) のまわりに培地が残っている場合、パスツールピペットあるいは清潔な柔らかい紙等を用いて吸い取ります。
このとき、パスツールピペット等による組織の吸引または穴を開けることのないように注意してください。以下の操作のパスツールピペットによる吸引除去作業においても同様に注意して行ってください。

(2)LSEをアッセイトレイの蓋にのせます。

(3)次に、アッセイリングの片面にシリコンを薄く塗りLSE表面に接着させる作業をします。

(4)アッセイリングをピンセットを用いて取り出し、片面にシリコンチューブのシリコンを薄く連続的に塗ります。

(5)アッセイリングをシリコン塗布面を下にしてLSE表面中央に置きます。ピンセットなどを用いてアッセイリング上面を軽く押し付けてLSEに密着させます。
トランスウェルの底面から見て、シリコンの接着面が連続的になるように接着させます。このとき、余分のシリコンがリング中央部にはみ出さないように、気をつけて行ってください。試験に用いる被検物の性状によりリングを必要としない場合は、この操作は不要です

(6)アッセイトレイの各ウェルに**LSEアッセイ培地 1．2ml** を入れます。

(7)アッセイリングを付けたLSEを、トランスウェル底面に気泡が入らないようにアッセイトレイに移します。

(8)被験物をアッセイリング中央部に必要量添加します。アッセイリングの中央部への適用量は、通常 80～200μl (固体の場合約80mg) を使用します。不溶性物質の場合は、アッセイ

トレイを天秤の上にのせて一定重量を秤量することで適用する事もできます。
通常、無処置対照群には、何も適用しないものを用いますが、被検物の溶剤として特別な溶媒を用いる場合は、使用される溶媒のみ添加したものを対照としてください。

(9)被験物を添加した後、アッセイトレイを37℃のCO_2インキュベーターに入れて薬剤暴露を行います。被験物による暴露は、EC50値を求める場合、通常 **16時間～24時間** の間で行います。実験の再現性を得る為に、一連の実験は、同じ暴露時間で行ってください。
ET50値を求める場合は、適当な暴露時間を設定して下さい。(例:4、8、12、16、24時間)

(10)被験物暴露後、アッセイリング内(または組織表面に残存する被験物)及びアッセイプレートの各ウェルの培地を吸引除去したのち、アッセイ培地で組織表面の**残存する被験物を洗い流し**ます。クリームなどの被験物の場合、LSE表面の被験物が洗い流せない場合があります。この場合は、スパーテル等を用いて組織を傷つけないように被験物を除いたのち、再度洗浄を行います。洗浄操作で、アッセイリングが組織からはがれる場合がありますが、その際は、はずして、組織のみで以後の操作を行ってください。
被験物が簡単に洗い流せない場合は、ピペット以外に洗瓶・シリンジなどで勢いよくLSEアッセイ培地を吹き付けるようにして下さい。

(11)アッセイトレイ内、トランスウェル内の培地を吸引除去します。この際、アッセイトレイのウェルに被験物の残存が認められるときは、アッセイ培地等で洗浄除去してください。MTTは還元物質により疑陽性発色が出る場合があります。被験物が、MTTと反応する場合は、ウェルを十分に洗浄後使用するか、または、新しいアッセイトレイの使用をお奨めします。

(12)トランスウェルの下側に**MTT培地** をアッセイトレイのウェルごとに **1．2ml** 分注した後、37℃のCO_2インキュベーターで、**3～4時間** インキュベートしMTT発色反応を行います。この場合、トランウェルの下側に気泡が残らないように注意してください。

(13)MTT発色反応終了後、LSEの組織中央部（アッセイリング内側、被験物質暴露部）を、バイオプシーパンチ（8mmφ）を用いてポリカーボネイトの**膜ごとくりぬき**、それぞれの切片を各1個ずつ栓付き小試験管（またはエッペンドルフチューブ）に入れていきます。

(14)その後、試験管に **酸性イソプロパノール液** を 0．3m l(分光光度計使用時は、最大1．0ml)加えます。切片が完全に浸かるようにしてください。**室温、暗所2時間 静置**により青色ホルマザンの抽出を行ってください。抽出時間は暗所で最高24時間まで可能です。

(15)抽出終了後、各試験管を攪拌し十分混和後、抽出されたホルマザンの**570nm(±30nm)の吸光度**を測定します。ブランクとしては、抽出に用いる酸性イソプロパノール液を用います。刺激性の強い被験物等を用いた場合、組織角質が崩れ濁りを示すときがありますが、そのときは、抽出液を、3000rpm、10分遠心操作を行った後、その上澄みを用いて測定してください。
測定に96穴プレートリーダーを用いる場合は、**96穴プレート**に**抽出液**を**200μl**入れて測定します。分光光度計を使用するときは、マイクロセルを用いて測定してください。抽出液量は、マイクロセルの容量にもよりますが、最大1．0mlまで上げて行うことができます。

(16)生存率の算出
各被験物の吸光度測定値からブランク値を引いた値を算出します。
同じく、無処置対照の測定値からブランクの値を引いた値を算出し、この値を100%として、各被験物の生存率を算出します。

■経皮吸収試験例
本LSE-highを用いた経皮吸収試験例を以下にお示しします。本モデルによる経皮吸収実験の参考にして下さい。

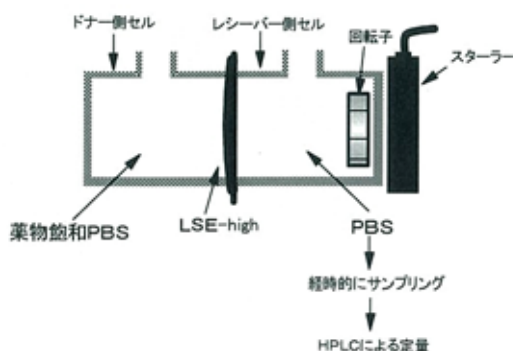
＜経皮吸収促進剤によるインドメタシンの透過性に及ぼす影響＞

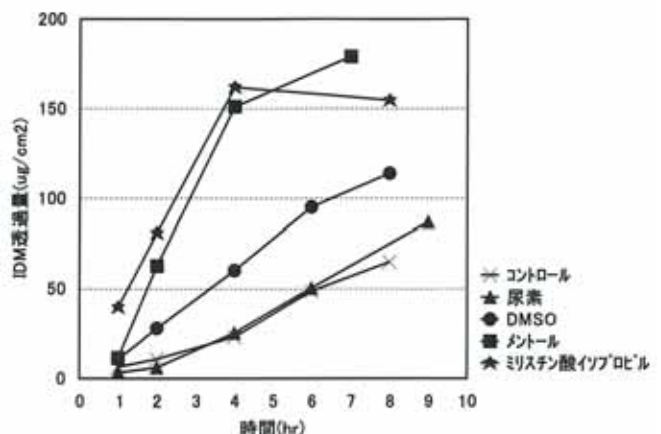
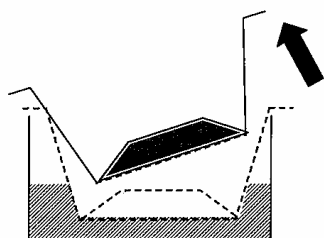
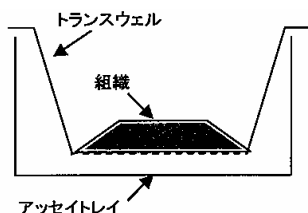
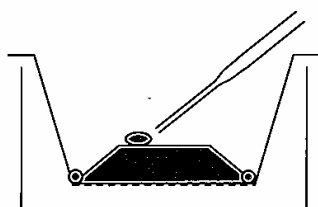
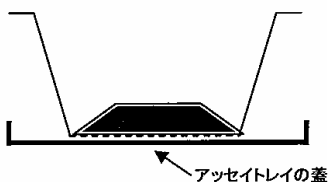
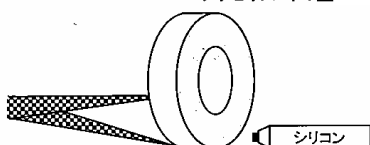
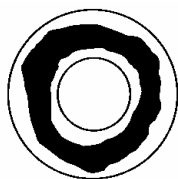
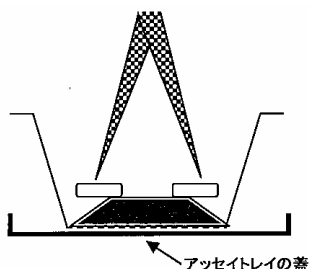
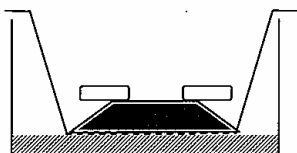
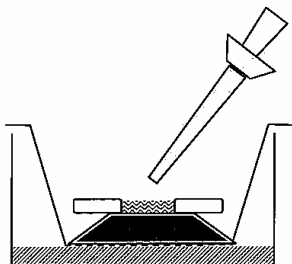
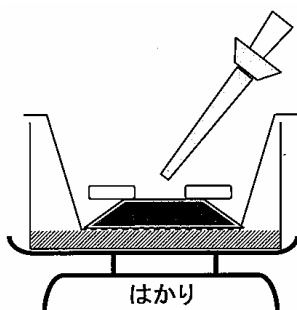
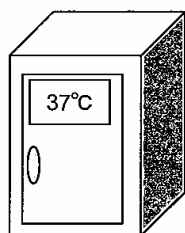
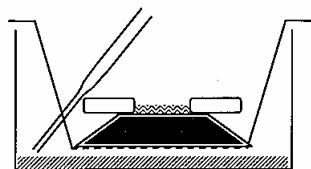
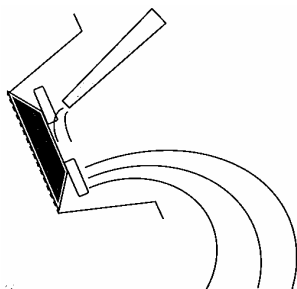
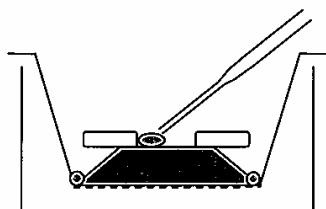
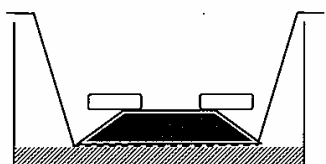
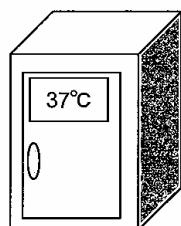
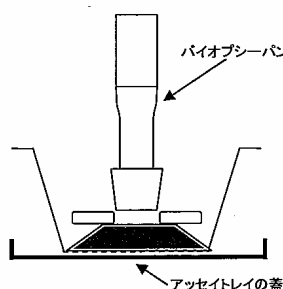
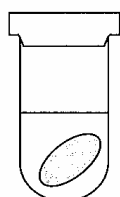
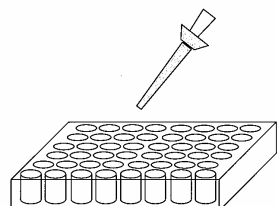
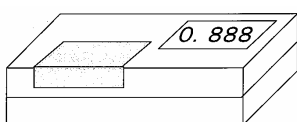
(1)使用器具：
　ピンセット、ピペット類、サンプルチューブ類、
　フランツセル（横形拡散チャンバー/内径10mm/容量3ml）、
　クリップ、スターラー、回転子（直径8mm）、
　測定溶媒（PBS）、薬物濃度測定機器（HPLC）

(2)測定試薬：
・ドナー側／　2.5ml下記試験溶液
　尿素・DMSO・メントール・ミリスチン酸イソプロピルの４種の経皮吸収促進剤の５%-PBS溶液を作製し、各溶液にインドメタシン（IDM）を懸濁させたもの
・レシーバー側／　3ml　PBS

(3)実験条件：　37℃（恒温室）

(4)HPLCによるIDM定量：
　溶媒／75%メタノール、検出波長／UV262nm、にてサンプル液を測定。
　IDM検量線より各センプル液中のIDM量を定量。

(5)実験方法：

LSE-high組織をポリカーボネート膜ごと切り抜き、組織側（角層側）をドナー側、ポリカーボネート膜側（真皮層側）をレシーバー側として、横形2チャンバー拡散セルに挟みこんだ。ドナー側に2.5ml各試験溶液、レシーバー側に3mlのPBSを入れた。系を37℃恒温室に保ち、経時的に0.5mlずつレシーバー側のPBSをサンプリングした。サンプル液中のIDM量をHPLCにより定量した。

(6)結果：
　各経皮吸収促進剤により効果の差異は認められるが、いずれもIDMの透過性を促進させる効果があることがわかる。

MTT試験方法（LSE）

組織トレイの蓋を開け、トランスウェルの片側をピンセットなどを用いて図のように持ち上げ、トランスウェルを輸送用培地(寒天培地)から外します。

トランスウェルをアッセイトレイに移します。

左図のように組織上に液体が残っている場合は、パスツールピペットあるいは柔らかい清潔な紙などで注意深く吸い取ってください。
注意：組織を吸わないように！！

トランスウェルをアッセイトレイの蓋にのせます。

アッセイリングを取り出し、ピンセットでつまみアッセイリングの片面にシリコンを薄く塗っていきます。

シリコン塗布は連続的になるようにします。

シリコン塗布面を下にしてLSE中央部にアッセイリングが位置するように取り付けます。ピンセットなどでアッセイリングの2点を垂直に押し付けます。押し付けるアッセイリングの箇所をかえながら、この操作を繰り返し接着させます。トランスウェルの裏から見て、シリコンが連続的になっていることを確認下さい。押し付ける際にリングをあまりずらさないように注意してください。また、強く押し付けるとLSE組織がつぶれることがあります。

アッセイトレイにアッセイ培地、1．2mlを入れます。そこにアッセイリングをつけたLSEを移します。

被験物添加は、溶液の場合シリコンリング中央へピペット等を用いて添加します。(80～200μl)

クリーム等で定量添加が困難な場合、アッセイトレイを秤の上に載せ重量で添加する事ができます。

被験物 添加後、インキュベーターに入れます。

被験物暴露の終了後、アッセイ培地及びアッセイリング内に残存する被験物を吸引除去します。

アッセイリング内に残存する被験物をアッセイ培地を吹きかけ除去します。(洗浄液はビーカー等に受けます。)
アッセイリングがはずれた場合は、アッセイリングを除いて操作を進めてください。

洗浄後、組織上に液体が残っている場合は、パスツールピペットあるいは柔らかい清潔な紙で注意深く吸い取ってください。
注意：組織を吸わないように！！

アッセイトレイに、MTT培地（MTTを溶解したアッセイ培地）を1．2ml入れます。

インキュベーターで3～4時間インキュベートし、MTT発色反応を行います。

MTT発色反応後、組織中央部をアッセイリング内側に沿って8mmφバイオプシーパンチで切除します。（ポリカーボネイト膜ごと切除します。）

組織片(ポリカーボネート膜ごと)をチューブに移し、300μlの酸性イソプロパノールを入れ青色ホルマザンの抽出を行います。
抽出時間は、室温、暗所2時間で行います。
抽出操作時、抽出液の蒸発を防ぐために、各試験管は栓をする必要があります。

抽出終了後、96穴プレートに抽出液を200μlずつ各ウェルに移します。

96穴プレートリーダーなどを用いて570nmの吸光度を測定します。

ご注意

・本品は、研究用に限定されていますので、ヒト又は動物へ適用すること、及び、in Vitro診断に適用することは認められません。
・有害なウイルス等の感染は、既知の方法で検査しておりますが、ご使用に際しては、十分ご注意ください。
・該当製品のご使用によって起こったい如何なる事故あるいは損害についても、当社は一切の責任を負わないことを、ご了解の上、ご使用ください。
・組織は、有限の寿命となっており、的確な実験を行って頂くためにも使用期限を守ってください。

■製造・販売元　　東洋紡績株式会社
（大阪）ライフサイエンス事業部　〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
Tel:06-6348-3786　FAX:06-6348-3833
（東京）ライフサイエンス事業部　〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町 17 番 9 号
Tel:03-3660-4819　FAX:03-3660-4951